

コレステロール生合成系及び異化代謝系関連化合物 の分析化学的研究

著者	税所 優
号	413
発行年	1999
URL	http://hdl.handle.net/10097/15382

氏 名 (本籍) ^{さい}税 ^{しょ}所 ^{ゆたか}優

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 薬 第 4 1 3 号

学位授与年月日 平 成 11 年 11 月 17 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目 コレステロール生合成系及び異化代謝系関連化合物
の分析化学的研究

論文審査委員 (主 査)
教授 後 藤 順 一 教授 竹 内 英 夫
教授 安 齋 順 一

論文内容要旨

コレステロールの生合成は酢酸を出発原料として二十数段階の複雑なステップを経て行われる。近年、これら一連のコレステロール生合成系酵素群を標的として生合成阻害による高脂血症治療薬の開発が行われている。とりわけ1976年糸状菌代謝産物より発見されたコンパクチン (ML-236B) が HMG-CoA 還元酵素を強力に阻害することが示されて以来、本酵素の阻害剤の開発が最も精力的に行われている。

一方、コレステロールから胆汁酸合成の異化代謝は、最初の反応であるコレステロール 7 α -水酸化酵素による水酸化が律速段階とされている。すなわち、腸肝循環により再吸収された胆汁酸によってこの酵素が制御を受ける。高脂血症治療薬として知られているコレステラミンは、この腸肝循環を破綻させることにより、胆汁酸生合成量を増大させ、その結果、血中コレステロールを低下させる。

これら高脂血症治療薬の開発にはコレステロールを中心とするその生合成及び異化代謝系関連化合物の信頼度の高い測定法が不可欠となる。すでに放射性酢酸を用いるコレステロール生合成中間体の測定法及びガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (GC/MS) を用いる肝組織中 7 α -ヒドロキシコレステロール (7-HC) の測定法が報告されている。しかしながら血液試料を用いて体内動態を解析し、薬物と薬理効果との関連を証明するには十分な方法とは言い難い。

一方、近年、癌遺伝子産物 Ras がステロール生合成中間体由来のプレニル基により修飾されることが明らかになり、コレステロール生合成の中間体と細胞の増殖、発癌シグナル伝達との関連からプレニル基のドナーとなるファルネシルピロリン酸 (FPP) に興味をもたれている。このためコレステロール生合成中間体として MVA のみならず FPP の血中レベルの測定法も強く望まれている。

以上のような背景から、本研究では血中 MVA, FPP 及び 7-HC の新規測定法を開発すると同時にイヌに用い、体内動態解析への応用を行った。

血漿中 MVA の測定

第1章では、MVA の 3,5-シスジオール及び β -hydroxy acid 構造に着目し、固相上にこれらの構造と選択的に環状ボロネートを形成するフェニルボロン酸 (PBA) を配した PBA 固相による抽出法を設定し、選択的な MVA 抽出を可能とした。さらに選択的かつ高感度検出を可能とする負イオン検出化学イオン化 (NICI)-MS 用誘導体として MVA のカルボキシル部位をペンタフルオロベンジル (PFB) 化、3,5-ジオール部位をボロネート化する GC/MS 用誘導体法を設定し、それらを組み合わせた新規高感度分析法を開発した。

血漿中 FPP の測定

第2章では、新規血漿中 FPP 測定法を開発を企図した。血漿中アルカリフォスファターゼにより FPP のピロリン酸を酵素水解し、遊離 farnesol を1級水酸基を利用するアンスロイル蛍光ラベル化法とカラムスイッチング法を組み合わせた HPLC による測定法を構築した。

血漿中 7-HC の測定

第3章では、7-HC のステロイド核上の 3,7 位の両水酸基にクマリン骨格をもつ発蛍光団を定量的に 2 個導入することを試み、蛍光検出による高感度な血漿中 7-HC の測定法を開発した。

さらに第4章では第1章から第3章までの測定法を用いて実試料に応用し、以下のような成果を得た。

血漿中 MVA, FPP 及び 7-HC 体内動態の測定

MVA：血中 MVA の日内リズム及びそれに影響する因子について、すでにヒト及びげっ歯類で報告されているが、イヌにおいてはまだ検討されていない。そこで第1章で開発した測定法を食事の有無におけるイヌ血中 MVA の日内レベル変動の測定に応用した。雌雄各3頭計6頭のイヌを用い、絶食と摂食（午前9時－10時）の2条件においてクロスオーバー実験を行った。その結果、実験開始の時点では絶食群と摂食群の間に MVA レベルの差は認められなかったものの、摂食終了から6時間後には摂食群のレベルは初期値の約2倍となり、24時間後には再び初期値レベルまで戻った。これに対し絶食群はそのまま初期値レベルを維持していた。

この結果は、1) 食後に血中 MVA レベルは上昇する、2) 絶食により、リズムがなくなるということを示しており、先に報告されているヒト及びラットの場合とほぼ一致した結果を示した。

FPP：まず、第2章で開発した測定法を用い、イヌ及びヒトにおける食事前の血漿中 FPP レベルを測定し、それらのレベルを初めて明らかにした。次いで MVA の場合と同様、本定量法を食事の有無におけるイヌ血中 FPP 日内レベル変動の測定に応用した。雌雄各3頭計6頭のイヌを用い、絶食と摂食（午前9時－10時）の2条件のクロスオーバー実験を行った。その結果、摂食終了から6時間後には摂食群のレベルは初期値の約2.7倍となった。一方、絶食群はほとんど初期値レベルを保持していた。

この結果により、血漿中では FPP レベルが MVA レベルと平行に変動することが初めて明らかとなり、血漿中 FPP がコレステロール生合成系の新しい指標となりうることを示したといえる。次にヒト血漿中 FPP リズム変動の測定を行った。さらには健康人男性6人について朝食摂食群（n=3）と絶食群（n=3）における血漿中 FPP の日内変動を追加した。しかしながら、朝食の有無における顕著な差は認められなかった。

7-HC：第3章で開発した測定法をコレステラミン投与時のイヌ血漿中の 7-HC レベルの測定に応用した。コレステラミンを 1 g/kg/day で28日間連続で経口投与を行った。その結果、コントロール群は実験を行った35日間をとおしてほぼ一定の値を示したのに対し、コレステラミン投与群は投与期間中、コントロール群に比し、約2倍の上昇が認められた。この値は既報におけるヒトの場合と比較して小さい。上昇していた 7-HC レベルもコレステラミン投与終了1週間後には初期値レベルまで戻った。

以上、コレステロール生合成系及び異化代謝系関連化合物の構造上の特徴を利用し、高感度かつ高選択

的な分析法を開発した。さらにイヌを用い、日内リズム変動や薬物投与における濃度変動など体内動態の測定に応用し得ることを示した。コレステロールを中心とした生合成及び代謝に関する機構は未解明の部分も多い。今回、開発した分析法は、これらの機構の解明並びに新規薬物の開発に大いに役立つことが期待される。

審査結果の要旨

今日、コレステロール生合成及び異化代謝系酵素を標的とする高脂血症治療薬の開発が盛んに行われている。これらは、その作用様式から大きく HMG-CoA 還元酵素の阻害と、コレステロール 7 α -水酸化酵素の活性亢進の2つのグループに分けられる。一方、コレステロール生合成中間体である farnesyl pyrophosphate (FPP) は、ユビキノンの生合成の重要な鍵化合物であり、高脂血症治療薬による副作用発現とも関わる。このため、有効性と安全性に優れる治療薬を開発する上で HMG-CoA 還元酵素、及びコレステロール 7 α -水酸化酵素により生成するメバロン酸 (MVA)、7 α -hydroxycholesterol (7 α -HC)、さらには FPP の薬物投与時における血中レベルを的確に把握する必要がある。

本研究では、こうした観点から三者の高感度測定法を確立すると共に、薬物投与時における血中濃度測定に適用した。

まず、MVA 測定法を開発を行った。MVA は分子内にシスジオール構造を持つカルボン酸であり、しかも開環型とラクトン型をとる。こうした物性に着目し、特異的誘導体化とクリーン・アップ法とを組み合わせ、負イオン検出ガスクロマトグラフィー／化学イオン化マスマススペクトロメトリーによる高感度測定法を構築した。

FPP は、極めて水溶性に富み、しかも各種検出器に高感度に応答する官能基を持っていない。そこでリン酸基が1級水酸基に結合していることに注目し、酵素的水解による遊離型への変換、及び1級水酸基の選択的蛍光誘導体化法を組み合わせた高速液体クロマトグラフ的測定法を設定した。

7-HC は、ステロイド核上に2個の水酸基を持つが、両者の立体的環境が異なり、反応性にも差がある。そこで比較的分子サイズの小さい水酸基用蛍光誘導体化剤を用いるベル化法を工夫し、高速液体クロマトグラフィーによる高感度測定を開発した。

最後にこれら測定法を薬物投与時の実試料に適用した。その結果犬においてもヒトと同様血中 MVA の日内リズムがあること、FPP の血中レベルは MVA のそれと平行に変動し、コレステロール生合成系の指標となりうること、さらに 7-HC の血中レベルのモニタリングが、同様に治療薬開発に有用な情報を提供することを明らかにした。

以上、本研究は、高脂血症治療薬開発に不可欠なコレステロール生合成及び異化代謝関連化合物の高感度測定を開発し、その有用性を証明したものであり、博士（薬学）の学位論文として合格と認める。